

Item 3-7.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-180719

(43)Date of publication of application : 13.08.1986

(51)Int.Cl.

A61K 35/30

A61K 37/20

(21)Application number : 60-019855

(71)Applicant : MITSUI TOATSU CHEM INC

(22)Date of filing : 06.02.1985

(72)Inventor : KOJIMA ATSUSHI
YOKOYAMA TATSURO
MORI HARUKI
ARITA MASANOBU

(54) METHOD FOR OBTAINING GANGLIOSIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a ganglioside present in a medium containing a specific organic solvent as a deposit in the presence of an alkali metal hydroxide or ammonia.

CONSTITUTION: A ganglioside dissolved in a solvent containing a lower alcohol, e.g. methanol or ethanol, is obtained as a deposit thereof having a high purity by keeping the system once at 30W60° C (phospholipid present in the crude ganglioside is removed by hydrolysis) in the presence of an alkali metal hydroxide or ammonia. The amount of the alkali metal hydroxide or ammonia to be used is preferably equivalent or more based on the sialic acid which is a constituent molecule of the ganglioside present in the solvent, and usually the same amount as the ganglioside W about 10 times based on the ganglioside.

EFFECT: The ganglioside can be recovered only by simple procedures such as alkali treatment and filtration, and most of the protein migrates into the filtrate and is removed.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-180719

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)8月13日

A 61 K 35/30
37/207138-4C
7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 ガングリオシドの取得方法

⑰ 特 願 昭60-19855

⑱ 出 願 昭60(1985)2月6日

⑲ 発 明 者 小 島 温 横浜市西区境之谷23番地
 ⑲ 発 明 者 横 山 辰 郎 横浜市金沢区並木3-5-10-404
 ⑲ 発 明 者 森 春 樹 横浜市戸塚区犬山町22番地120
 ⑲ 発 明 者 有 田 政 信 横浜市磯子区汐見台1-4-1409-902
 ⑲ 出 願 人 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号

明 細 書

1. 発明の名称

ガングリオシドの取得方法

2. 特許請求の範囲

- 1) 低級アルコールを含有する溶媒中に溶解しているガングリオシドを、アルカリ金属水酸化物又はアンモニアの存在下に析出物として取得する方法。
- 2) 低級アルコールがメタノール又はエタノールであることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。
- 3) アルカリ金属水酸化物又はアンモニアの存在する系を一旦40～60℃の温度に維持して行なうことを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は特定の有機溶媒を含む媒体に存在するガングリオシドを取得する方法に関するものである。ガングリオシドは人及び動物の脳に多く含まれている糖脂質の1種で、その構成成分の一つで

あるシアル酸の結合数及び結合位置によって多数の分子種があり、ガングリオシドとはそれらの総称である。

近年、ガングリオシドの生体内での作用の解明が進歩しており、医薬品として中枢および末梢神経系の刺激伝達障害の治療に利用されている。従来技術

これまでガングリオシドの抽出、精製方法について種々報告がなされている。例えば Svennerholm らの方法(Biochim. Biophys. Acta, 61 17 巻(1980) 97～109頁)によれば、組織からクロロホルム、メタノール及び水の混合溶液によって抽出し、フォルチの分配(J. Polch, J. Biol. Chem. 226 巻(1957) 497-509頁)によってガングリオシドを水性溶液として分離し、消泡剤を添加しながら蒸発乾固し、粗製のガングリオシドを得ている。また医薬品に応用する目的で別の抽出法が特許出願されている。(フィディーア、ソシエタ、ベル、アチオニ、特開昭52-34912)この方法では動物の脳からガングリオシドをテトラヒ

特開昭61-180719(2)

ドロフランにより抽出し、エーテルと水を加えて分配し、下層の水性溶液をイオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、水酸化バリウムで沈澱として分離し、これを塩酸水溶液に溶解して透析したのち蒸発乾固し、前述のフォルチの分配により水性溶液とし凍結乾燥して製品としている。

解決しようとする問題点

このようにガングリオシドを含む大量の水性溶液からガングリオシドを単離する方法は、発泡を抑えながら蒸発乾固するか、水酸化バリウムにより不溶性塩を生成し塩酸で塩を脱離し透析したのち凍結乾燥するか、あるいはイオン交換カラムへ、吸、脱着する方法であり、いずれも大量のガングリオシドを調製することを非常に困難にしている。

問題解決の手段

本発明者らは大量のガングリオシドを効率的に精製取得する方法について研究を重ねた結果、動物の脳から抽出したガングリオシドのメタノール溶液をそのまま冷却するとガングリオシドが析出することを見出し特許出願した(特願昭59-

好ましくは70%以上がよく、水溶液あるいは低級アルコールの含有率の小さい溶液には、メタノール、エタノール、n-プロパノールあるいはiso-プロパノール等の低級アルコールを単独または混合して追加するのが良い。低級アルコールの含有率が小さく、含水率が大きいとガングリオシドの回収率が低下する。

添加するアルカリ金属水酸化物としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよび水酸化リチウムがあり、その他アンモニア水でも良い。これらの効果はガングリオシドの回収率を著しく向上させることにある。そしてアルカリ金属水酸化物あるいはアンモニアの存在する系を一旦30~60℃の温度に維持することは、粗製ガングリオシド中に共存するリン脂質を加水分解して除去することにより取得されたガングリオシドの純度を高いものとする効果がある。アルカリ金属水酸化物あるいはアンモニアの使用量は溶媒中に存在するガングリオシドの構成分子であるシアル酸と当量以上が好ましく、通常はガングリオシドと同量ないし

35303)。さらに研究の結果ガングリオシドの水溶液あるいは有機溶媒を含んだ水溶液に多量の低級アルコールを加えて冷却するとガングリオシドが析出することを見出した。そしてさらにいづれの場合も特にアルカリ金属水酸化物又はアンモニアの存在下ではガングリオシドの回収が量的にも質的にも著しく改善されることを見出して本発明を完成した。

本発明に言う低級アルコールを含有する溶媒とは、特にメタノールおよびエタノールを含有する溶媒であり、n-又はiso-プロパノールを含むものであっても良い。そしてこの溶媒の系には通常は水が存在する。更にこの溶媒系には少量のテトラヒドロフラン、クロロホルムあるいはエーテル等が存在していてもよい。例えば前述したフォルチの分配によって生じた上層あるいはテトラヒドロフラン、エーテルおよび水の分配によって生じた下層等に低級アルコールを添加したものがこれに当る。

また低級アルコールの含有率は約20%以上、

10倍量程度使用される。この処理方法としてはガングリオシドを含んだ溶液に低級アルコールとアルカリ金属水酸化物あるいはアンモニアを加え、リン脂質を分解する場合にはこれが消失するまで40~60℃で加熱攪拌したのち充分冷却して析出物を回収する。低級アルコールの添加はリン脂質を分解したあとでも良い。

発明の効果

本発明の方法によれば、従来、非常に困難であった強発泡性のガングリオシド水性溶液の濃縮によるガングリオシドの回収が、アルカリ処理と浮過といった簡単な操作のみとすることができる。ガングリオシドの回収率はアルカリ金属水酸化物あるいはアンモニアが存在しない場合には約50%程度であるが本発明の方法によれば90~95%に達する。さらに本発明のもう一つの特徴は夾雑している蛋白質の大部分が浮液に移行して除去されることである。したがって前述したフォルチの上層から本発明の方法で得たガングリオシドは60~70%の純度を持ち、若干の糖脂質、中性糖

特開昭61-180719(3)

脂質を含み、蛋白質、リン脂質をほとんど含んでいない。このガングリオシドをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで処理することにより、容易に精製して医薬用に供しうる。

本発明をさらに具体的に説明するために実施例を示す。

実施例 1.

アセトンで脱脂、脱水した牛脳からメタノールで抽出したガングリオシドをクロロホルム、メタノールおよび水で分配した上層の水性溶液500ml(シアル酸1.79g、ガングリオシド換算5.73g含有、水約240mlを含む)にメタノール700mlと水酸化ナトリウム23gを加え、50℃で1時間攪拌した。反応後0～5℃に冷却して析出物を吸引濾過し、冷メタノール100mlで洗浄した。減圧乾燥して8.2gのガングリオシドを得た。シアル酸分析によるとガングリオシドの純度は64.3%で回収率は92%であった。

このガングリオシドは薄層クロマトグラフィーで展開し、レゾルシノールで発色させてガングリ

オシドの各分子種の組成をしらべたが、原料とした水性溶液中の組成と変化がなかった。オルシノールで発色させると硫糖脂質および中性糖脂質の存在が確認された。モリブデン酸、およびニンヒドリンによる発色はほとんど無かった。同様に濾液を検査したところ、ニンヒドリンの発色が強く、レゾルシノールの発色は弱く、他の発色はほとんど無かった。

実施例 4.

粗ガングリオシド2.0g(シアル酸18.8%含む、ガングリオシドとして1.2g)をメタノール100mlに加温溶解し、少量の不溶物を濾過して除去した。この溶液に10%カセイソーダのメタノール溶液12mlを加え、冷却して析出物を濾取し、冷メタノール20mlで洗浄した。乾燥して結晶1.6gを得た(シアル酸21.6%を含む、ガングリオシドとして1.1g)回収率92%であった。

実施例 5.

実施例4と同様のガングリオシドのメタノール溶液を用いて、カセイソーダのメタノール溶液にかえて、濃アンモニア水5mlを加えて結晶1.7gを得た。(シアル酸20.3%を含む、ガングリオ

シドの各分子種の組成をしらべたが、原料とした水性溶液中の組成と変化がなかった。オルシノールで発色させると硫糖脂質および中性糖脂質の存在が確認された。モリブデン酸、およびニンヒドリンによる発色はほとんど無かった。同様に濾液を検査したところ、ニンヒドリンの発色が強く、レゾルシノールの発色は弱く、他の発色はほとんど無かった。

実施例 2.

実施例1と同様に処理したガングリオシドの水溶液310ml(ガングリオシドとして6.98mg/ml含む、水約135ml)に水酸化カリウム10gをメタノール100mlに溶解して加え、40℃で1時間攪拌したのちメタノール250mlを加え、次いで氷冷し、析出物を吸引濾過し冷メタノール50mlで洗浄し、減圧乾燥してガングリオシド3.4g回収した。純度59.5%回収率93.6%であった。

実施例 3.

実施例1と同様に処理したガングリオシドの水溶液100ml(ガングリオシドとして2.5g含む、

シドとして1.1g)回収率は92%であった。

特許出願人 三井東圧化学株式会社